

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08078

研究課題名(和文)メダカを用いた新規精巣毒性評価系の構築

研究課題名(英文) Establishment of novel testicular toxicity evaluation system using medaka

研究代表者

杉山 晶彦 (Akihiko, Sugiyama)

岡山理科大学・獣医学部・教授

研究者番号：00432609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：メダカを用いた精巣毒性評価系が化学物質曝露の精巣への影響を評価する系として有用か否かを明らかにすることを最終目的として、精巣毒性物質カドミウム、メトトレキサートのメダカ成魚期曝露が精巣に及ぼす影響およびメトトレキサートのメダカ胚・仔魚期曝露が精巣の発達に及ぼす影響に関する解析を実施した。カドミウム、メトトレキサートのメダカ成魚期曝露が精巣に及ぼす影響およびメトトレキサートのメダカ胚・仔魚期曝露が精巣の発達に及ぼす影響は、これらの化学物質がげっ歯類の精巣に及ぼす影響とほぼ同様であり、メダカを用いた精巣毒性評価系が化学物質曝露の精巣への影響を評価する系として有用であることを示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、化学物質の精巣毒性評価系における評価動物としてのメダカの有用性を示唆する結果が得られた。げっ歯類を評価動物とした毒性試験が、3Rの原則の観点よりその実施の必然性を厳しく問われる社会情勢下において、本研究成果は非常に有意義なものであるといえる。また、本研究は、カドミウムおよびメトトレキサートといった水系環境を汚染する化学物質が水圏脊椎動物の精巣に及ぼす影響の全貌解明に迫るものであり、本研究成果は生態系に及ぼす化学物質のリスク評価という観点からも有意義である。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of establishment of the novel testicular toxicity evaluation system using medaka, the effects of the exposure of adult medaka to the testicular toxic chemicals, cadmium and methotrexate on testis, and the effects of the exposure to methotrexate in the medaka embryo and sac-fry stages on testicular development were examined. The effects of the exposure of medaka to cadmium and methotrexate on testis were similar to the effects of the exposure of rats and mice to cadmium and methotrexate on testis. The results of this research suggest that medaka is useful as the alternative animals to rodents in the testicular toxicity evaluation system.

研究分野：毒性病理学

キーワード：メダカ 精巣 メトトレキサート カドミウム 細胞死 アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現行の医薬品・化学物質の in vivo における毒性評価は、主としてラット・マウス等のげっ歯類を用いた動物実験によってなされているが、今後、げっ歯類を用いた動物実験は、3R の原則 (Refinement、Replacement、Reduction) の観点より、実施の必然性を益々厳しく問われることになることが予測される。一方、培養細胞等を用いた in vitro 毒性評価系は、特定の毒性表現型を検出するためには有効な手段となるが、複数の組織が関与するような複合的な作用機序に基づく毒性を検出することは不可能である。これらの理由により、げっ歯類に替わる新たな実験動物を用いた in vivo 毒性評価系の構築が期待されている。

メダカはゼブラフィッシュ等の他の小型魚類に比較し、低温環境に強く、酸素要求性が低いといった優れた環境適応性を有し、全ゲノム配列も既に解明されている (Exp Anim 59: 13-23. 2010.)。さらに、低コストで大量の解析を実施することが可能であることから、メダカは様々な研究分野において実験動物・モデル生物として繁用されている。化学物質の毒性試験においても既にメダカは用いられており、国際的に合意された化学物質の安全性評価指針である OECD (経済協力開発機構) ガイドラインにおける、魚類を用いた総ての毒性試験の試験動物にメダカが含まれている。しかしながら、現行のメダカを用いた毒性試験では、生存挙動、行動学的変化、外観の変化のみが着眼されているに過ぎず、メダカの臓器・組織が種々の化学物質の曝露に対し具体的にどのような病態を示し、当該病態がどのような毒性学的意義を示すのかに関する詳細な知見は乏しい現状にある。

不妊は深刻な社会現象の一つであるが、その原因として、精子形成に関わる主要な雄性生殖器官である精巣に対する化学物質の影響が注目されている。一方、メダカの精巣組織では他動物と異なり、精原細胞、精母細胞、精細胞、伸長精細胞が各分化段階に分かれて分布しているため、他動物と比較し組織レベルでの解析が容易である。申請者は、当該事項に着眼し、メダカを用いた新規精巣毒性評価系の構築を計画するに至った。雄の野生型メダカ成魚に対し、精巣毒性物質として知られるカドミウムを曝露した後、精巣組織の病理組織学的解析を行った。その結果、カドミウム曝露により、メダカ精巣の精原細胞および精母細胞において細胞死が用量依存性に惹起されることが明らかとなり、メダカは精巣毒性を評価する試験動物として有用である可能性が示された (第 33 回 日本毒性病理学会発表)。

2. 研究の目的

本研究では精巣毒性に着眼し、化学物質曝露によってメダカ精巣に誘発された病態・発症機構および化学物質に対するメダカ精巣組織の感受性を臓器・組織レベルで解析し、メダカにおける知見とげっ歯類における知見を比較することにより、両者における相同性・相違性を明らかにすることを旨とする。本研究の目的は、メダカを用いた精巣毒性評価系が化学物質曝露の精巣への影響を評価する系として有用か否か、また、本評価系がげっ歯類を用いた精巣毒性評価系の代替法として有効か否かを明らかにすることにある。

3. 研究の方法

(1) 精巣毒性物質カドミウム、メトトレキサートのメダカ成魚期曝露が精巣に及ぼす影響

カドミウムのメダカ成魚期曝露が精巣組織に及ぼす影響

塩化カドミウムを溶解した塩素除去水で野生型メダカを 4 日目まで飼育することにより、メダカへのカドミウム曝露をおこなった。カドミウム曝露開始後 1、2、3、4 日目にサンプリングを実施した。ブアン固定後、パラフィン包埋切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色、TUNEL 染色、cleaved caspase-3 および phospho-histone H3 を一次抗体とした免疫組織化学染色を実施した。

メトトレキサートのメダカ成魚期曝露が精巣組織に及ぼす影響

メトトレキサートを溶解した塩素除去水で野生型メダカおよび p53 遺伝子ホモ欠損型メダカを 4 日目まで飼育することにより、メダカへのメトトレキサート曝露をおこなった。メトトレキサート曝露開始後 1、2、3、4、5、7、9、11、18、25、32 日目にサンプリングを実施した。ブアン固定後、パラフィン包埋切片を作製し、HE 染色、TUNEL 染色、cleaved caspase-3 および phospho-histone H3 を一次抗体とした免疫組織化学染色を実施した。また、apoptosis 関連因子および精巣組織特異的因子の発現状況を評価することを目的とし、リアルタイム PCR 法を用いた分子生物

学的解析を実施した。

(2) 精巣毒性物質メトトレキサートのメダカ胚・仔魚期曝露が精巣の発達に及ぼす影響

Stage 17 の初期胚 (器官形成期) から孵化後 20 日目に至るまで、連続的にメトトレキサートに曝露させた野生型メダカ稚魚および成魚の精巣を、病理組織学的手法、免疫組織学的手法、リアルタイム PCR 法を用いた分子生物学的手法を用いて解析した。

4 . 研究成果

(1) 精巣毒性物質カドミウム、メトトレキサートのメダカ成魚期曝露が精巣に及ぼす影響

カドミウムのメダカ成魚期曝露が精巣に及ぼす影響

カドミウムを野生型メダカ成魚に曝露したところ、曝露開始後 4 日目までに精原細胞および精母細胞に pyknosis が誘発された。当該 pyknotic cells の殆ど総てが TUNEL 染色および cleaved caspase-3 に陽性を示したことから、apoptosis によって生じたことが明らかとなった。カドミウム曝露を受けたメダカの精原細胞および精母細胞の phospho-histone H3 陽性率には著変は認められず、細胞増殖活性に対する影響は認められなかった。カドミウムによってメダカ精巣に誘発された当該病変の病理組織学的所見は、カドミウム曝露を受けたげっ歯類の精巣病変のそれに酷似していた (J Reprod Infertil. 16: 24-29. 2015.; Anat Rec (Hoboken). 294: 520-526. 2011.)。

メトトレキサートのメダカ成魚期曝露が精巣に及ぼす影響

メトトレキサート曝露を受けた野生型メダカ成魚および p53 遺伝子ホモ欠損型メダカ成魚の精原細胞および精母細胞において pyknosis が誘発された。メトトレキサート曝露を受けた野生型メダカの精巣における pyknotic cells 存在率は、曝露開始後 3 日目から 11 日目まで有意な増大を示した。一方、メトトレキサート曝露を受けた p53 遺伝子ホモ欠損型メダカの精巣では、曝露開始後 5 日目から 32 日目まで有意な増大を示した。メトトレキサート曝露を受けた野生型メダカの曝露開始後 3 日目から 4 日目までに誘導された pyknotic cells では cleaved caspase-3 陽性を示すものが優勢であったことに対し、曝露開始後 5 日目以降に野生型メダカおよび p53 遺伝子ホモ欠損型メダカにおいて誘発された pyknotic cells では cleaved caspase-3 陰性を示すものが優勢であった。また、曝露開始後 5 日目以降における cleaved caspase-3 陽性率は、野生型メダカでは曝露開始後 5 日目から 7 日目にかけて有意な上昇を示していたことに対し、p53 遺伝子ホモ欠損型メダカでは曝露後 9 日目から 18 日目にかけて有意な上昇が認められた。すなわち、メトトレキサート曝露による p53 依存性 apoptosis は p53 非依存性 apoptosis よりも早期に誘導されること、メトトレキサート曝露によりメダカの雄性生殖細胞に遅発性に誘発される pyknosis には caspase-3 依存性 apoptosis と caspase-3 非依存性細胞死が混在するが、後者がより高頻度に誘発されることが明らかとなった。

メトトレキサート曝露を受けたマウスの精巣に誘導された apoptosis の分子機構に、p53 遺伝子発現が関与する経路が存在することが報告されている (Int J Fertil Steril. 9: 541-547. 2016)。前述した本研究の結果より、メダカ精巣雄性生殖細胞において、p53 遺伝子は DNA 損傷を受けた雄性生殖細胞を速やかに apoptosis に導く役割を担っている可能性が示唆された。γ 線曝露を受けた野生型マウス小腸粘膜上皮において、p53 遺伝子依存性 apoptosis が p53 遺伝子非依存性 apoptosis よりも早期に誘発されることが明らかにされている (Oncogene. 9: 1767-1773. 1994.)。また、caspase-3 非依存性の細胞死としては、ミトコンドリア蛋白質 AIF (Apoptosis inducing factor) によって誘発されるプログラム細胞死、オートファジーによるプログラム細胞死、ネクローシスなどが知られている (Nat Med. 11: 725-730. 2005.; Biochem Biophys Res Commun. 396: 95-100. 2010.; Antioxid Redox Signal. 14: 2545-2579. 2011.)。

p53 遺伝子ホモ欠損型メダカの精原細胞および精母細胞の分布領域では精巣卵が散見されたが、当該精巣卵はメトトレキサート曝露によって有意な増加を示した。p53 遺伝子ホモ欠損型メダカにおける精巣卵存在率はメトトレキサート曝露開始後 11 日目が最も高値であり、その後経時的に漸減した。γ 線の曝露を受けた p53 遺伝子ホモ欠損型メダカの精巣において、同様の病理組織学的変化が認められたとの報告がなされている (Cell Death Dis. 3: e395. 2012.)。メダカ精巣では、p53 遺伝子が精原細胞の卵細胞への分化を抑制する役割を担っていることが、過去の研究により既に明らかにされている (Cell Death Dis. 3: e395. 2012.)が、本研究結果および既報論文結果 (Cell Death Dis. 3: e395. 2012.)より、p53 遺伝子欠損状態において DNA 損傷が負荷された際

に、精原細胞の卵細胞への分化が顕著化する可能性が示唆された。

メトトレキサート曝露を受けた野生型メダカ成魚の精巣では、精原細胞特異的因子 Oct3/4 m-RNA および精母細胞特異的因子 TH2B、p19 m-RNA の発現減少が誘発された。また、当該メダカ精巣では、apoptosis 促進因子である Bax、Bad、Bid、Bik、Bim m-RNA の発現増大、抗 apoptosis 因子である Bcl-2、Bcl-xL m-RNA の発現減少が認められた。メトトレキサート曝露により誘導されたメダカ精原細胞および精母細胞の apoptosis の分子機構には、当該因子が関与していることが明らかとなった。マウスの精巣において、メトトレキサート曝露により誘導された apoptosis の分子機構に bax m-RNA の増大、bcl-2 m-RNA の発現減少が関与していることが報告されている (Int J Fertil Steril. 9: 541-547. 2016.)。

(2) 精巣毒性物質メトトレキサートのメダカ胚・仔魚期曝露が精巣の発達に及ぼす影響

Stage17 の初期胚より孵化後 20 日まで連続的にメトトレキサートの曝露を受けたメダカ成魚の精巣は矮小化し、また、当該精巣では精原細胞および精母細胞の有意な減数が認められた。当該メダカの精原細胞および精母細胞における phospho-histone H3 陽性率および PCNA 陽性率は有意な低下を示した。また、メトトレキサートの胚・仔魚期曝露を受けたメダカ稚魚および成魚の精巣では、cyclin dependent kinase 阻害因子 p21 および p16 m-RNA の発現増大および精原細胞特異的因子 Oct3/4 m-RNA の発現減少が認められた。これらの結果より、メトトレキサートの胚・仔魚期曝露より誘発された精巣の発達不全には、cyclin dependent kinase 阻害因子 p21 および p16 による細胞周期停止が関与していることが示唆された。メトトレキサートの曝露を受けたラット新生児において小脳低形成が誘発され、当該小脳の外顆粒層細胞において p21 の発現増大が惹起されたことが報告されている (J Vet Med Sci. 77: 789-797. 2015.)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hirako A, Takeoka Y, Furukawa S, Sugiyama A.	4. 巻 30
2. 論文標題 Effects of cadmium exposure on medaka (<i>Oryzias latipes</i>) testes.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Toxicologic Pathology	6. 最初と最後の頁 255-260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1293/tox.2017-0015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirako A, Takeoka Y, Furukawa S, Sugiyama A.	4. 巻 30
2. 論文標題 Effects of methotrexate exposure on medaka (<i>Oryzias latipes</i>) testes.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Toxicologic Pathology	6. 最初と最後の頁 283-289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1293/tox.2017-0029.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉山晶彦, 竹岡勇樹, 平光彩乃, 竹内 崇, 古川 賢.
2. 発表標題 カドミウム曝露がメダカ (<i>Oryzias latipes</i>) 精巢に及ぼす影響に関する病理組織学的検討.
3. 学会等名 第33回日本毒性病理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 杉山晶彦, 平光彩乃, 竹岡勇樹, 竹内 崇, 古川 賢, 成瀬 清.
2. 発表標題 葉酸代謝拮抗剤メトトレキサート曝露がメダカ (<i>Oryzias latipes</i>) 精巢に及ぼす影響.
3. 学会等名 第4回日本獣医病理学専門家協会 (JCVF) 学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----